

ДЕЙСТВИЕ АНТИСЫВОРОТКИ К ЗМЕИНОМУ ЯДУ НА МОДЕЛЯХ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА У КРЫС

Александр Борисович ПУПЫШЕВ¹, Светлана Ивановна ПРОЦЕНКО¹, Владимир Георгиевич ВИСКУНОВ^{1, 2}, Александр Петрович НАДЕЕВ¹, Марина Александровна СИНИЦЫНА², Александр Михайлович ФЕЩЕНКО³, Заза Юзаевич ЧУБЕНИДЗЕ³

¹ ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, Новосибирск, Красный проспект, 52

² ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН
630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

³ Городская клиническая больница № 25
630075, Новосибирск, ул. А. Невского, 1а

Исследовано терапевтическое действие антисыворотки к змеиному яду (150 АЕ/кг массы тела) при остром панкреатите, вызываемом введением крысам трипсина (50 мг/кг) или змеиного яда гадюки обыкновенной (1 мг/кг). В обоих случаях применение антисыворотки резко снижало смертность животных, подавляло геморрагический некроз поджелудочной железы, поражение внутренних органов. Терапевтическая эффективность антисыворотки оказалась подобной действию сандостатина. Позитивное действие антисыворотки связано, по-видимому, с ингибированием фосфолипазы А2 и подавлением активности геморрагических факторов.

Ключевые слова: острый панкреатит, крысы Вистар, трипсин, змеиный яд, сандостатин, антисыворотка к змеиному яду.

Впервые возможность лечения острого экспериментального панкреатита с помощью антисыворотки (АС) к змеиному яду была показана достаточно давно [1], однако в последующем эти исследования не получили развития. Очевидно, что действующими факторами АС являются антитела к белковым компонентам яда. Эффективность АС к змеиному яду оценивают по ряду параметров, в частности, по снижению смертности животных, подавлению геморрагической, протеолитической, эдематозной, миотоксической, коагуляционной и других активностей яда [2, 3], при этом наибольший интерес исследователей связан с «геморрагическими» металлопротеиназами [4, 5] и их инаktivацией.

Основной эффект повреждения поджелудочной железы (ПЖ) при введении трипсина и змеиного яда, вероятно, достигается за счет повышенной активации зимогенных гидролаз под действием трипсина или дезинтеграции мембран фосфолипазой и активации зимогенов под действием лизосомных ферментов [6]. С другой стороны, известно, что чем больше активность фосфолипазы в змеином яде, тем выше летальность его действия [7]. АС к змеиному яду практически полностью устраняет его фосфолипазную активность [8]. Поскольку эндогенной фосфолипазе А2 отводится суще-

ственная роль в формировании острого панкреатита различной природы, то представляется обоснованным исследовать действие АС к змеиному яду в экспериментальной терапии разных моделей острого панкреатита.

Целью настоящего исследования стало выявление терапевтического эффекта АС к змеиному яду на моделях острого экспериментального панкреатита, индуцируемого трипсином и змеиным ядом, и сравнение его с действием стандартного терапевтического средства сандостатина [9].

Материал и методы исследования

Использованы крысы линии Вистар массой 200–250 г. Содержание и обращение с животными соответствовали требованиям приказа Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г. Применяли легкий эфирный наркоз. Острый панкреатит моделировали введением трипсина и змеиного яда в брюшную полость. Животным под эфирным наркозом вскрывали брюшную полость и в ПЖ по ходу общего панкреобилиарного протока со стороны его вхождения в двенадцатиперстную кишку вводили раствор трипсина (ООО «Самсон-Мед», Россия) в концентрации 10 мг/мл в дозе 50 мг/кг массы тела. Аналогичным образом вводили раствор яда гадюки обыкновенной (*Vipera berus* L.) (ООО «Сибирский серпентарий», Россия)

Пупышев А.Б. — канд.б.н., старш.н.с. ЦНИО, e-mail: apupyshev@mail.ru

Проценко С.И. — канд.м.н., ассистент кафедры поликлинической хирургии

Вискунов В.Г. — д.м.н., профессор, главн.н.с. лаборатории патофизиологии, общей патологии и патоморфологии НИИРППМ, профессор кафедры госпитальной хирургии Новосибирского ГМУ, e-mail: apupyshev@mail.ru

Надеев А.П. — д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической анатомии

Синицына М.А. — н.с. лаборатории патофизиологии, общей патологии и патоморфологии

Фещенко А.М. — канд.м.н., зам. главного врача

Чубенидзе З.Ю. — хирург-ординатор

в концентрации 0,1 мг/мл в дозе 1 мг/кг массы тела. Далее животным двух групп с острым панкреатитом, развившимся соответственно после введения трипсина и змеиного яда, внутрибрюшинно вводили сандостатин («Новартис Фарма», Россия) в дозе 0,35 мг/кг массы тела. Препарат вводили вскоре после геморрагического пропитывания ткани ПЖ, через 5–7 мин после инициации панкреатита токсинами. В двух других группах животных с введением змеиного яда и трипсина изучали действие лошадиной сыворотки против яда гадюки обыкновенной (НПО «Микроген», Россия) после внутрибрюшинной инъекции в дозе 150 АЕ/кг массы тела. В каждую экспериментальную группу входило по 21 животному. Контролем служили животные с соответствующим острым экспериментальным панкреатитом.

В течение 3 ч следили за морфологическими изменениями органов брюшной полости, в ряде случаев забирали выпот для анализа на амилазную активность. Затем брюшную полость зашивали и животных возвращали в клетку. Через 24 ч оценивали смертность животных, у выживших крыс проводили релапаротомию и забирали материал для морфологического исследования. Образцы печени, ПЖ, двенадцатиперстной кишки (ДПК), толстой и тонкой кишок фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование проводили в универсальном микроскопе Leica DM 4000B (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 320 (Германия) и компьютерной программы Leica QWin V3.0.

Результаты исследования

В предложенных нами моделях острого панкреатита в течение 3 мин после введения трипсина и змеиного яда развивался серозный отек ПЖ, на фоне которого появлялись точечные геморрагии, превращающиеся в геморрагическую имбибицию ткани ПЖ. В дальнейшем наблюдался геморрагический панкреонекроз, и на следующий день регистрировалась высокая смертность животных: при введении трипсина — 71,4% (15 летальных исходов), при введении змеиного яда — 80,9% (17 случаев гибели).

1. Действие сандостатина при моделировании острого панкреатита введением змеиного яда

Введение сандостатина через 5–7 мин после инъекции яда не препятствовало геморрагическому пропитыванию ткани ПЖ. В двенадцатиперстной кишке (ДПК) наблюдался очаг ярко-красной гиперемии размером до 1 см. Печень приобретала темно-вишневую окраску

(через 15–20 мин). Выпот в брюшной полости был скудным, амилазная активность в пределах нормы (до 220 ед.). В течение первого часа увеличивались интенсивность окраски и размеры очагов гиперемии органов брюшной полости, но никогда не наблюдалось некроза тканей. К концу 3-го часа состояние животных стабилизировалось, в сравнении с контролем локальная гиперемия спадала, цвет печени приближался к норме.

Через 24 ч выживаемость животных составила 85,7% (18 из 21). Поведение крыс было активным. Животным делали релапаротомию, ревизию и биопсию органов брюшной полости. Выпота в брюшной полости не наблюдалось. В ПЖ в месте введения яда наблюдался инфильтрат дисковидной формы с наличием единичных кровоизлияний, остальная часть была бледно-серого цвета, слегка инфильтрирована. Наблюдалась легкая отечность стенки ДПК. Печень была рыхловатого вида, иногда темнее обычного.

При светооптическом исследовании отмечалось сохранение архитектоники ПЖ (рис. а), но при этом наблюдались полнокровие, отек стромы, участки дистрофически измененных паренхиматозных клеток, отмечалась диффузная воспалительная инфильтрация стромы органа, состоящая преимущественно из нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов. В печени наблюдалось неравномерное полнокровие, признаки жировой дистрофии гепатоцитов, очаги некроза не выявлены. В ДПК структура ворсинок сохранена, в собственной пластинке регистрировался умеренный отек.

Таким образом, применение сандостатина оказывало выраженное положительное влияние на состояние ПЖ и органов брюшной полости, резко снижало смертность животных, устраняло некроз клеток ПЖ.

2. Действие сандостатина при моделировании острого панкреатита введением трипсина

Применение сандостатина на фоне действия трипсина приводило в общих чертах к сходному результату. Отмечалось уменьшение очагов геморрагического пропитывания ПЖ и ДПК в сравнении с контролем (моделированием острого панкреатита), которые при этом оставались ярко-красными. Цвет печени становился ярко-вишневым, но далее не темнел. К концу 3-го часа геморрагический очаг в ПЖ светлел и уменьшался в размерах. Паренхима печени принимала обычную окраску.

Через 24 ч все животные выживали. В брюшной полости выпота не было. В области ПЖ был виден инфильтрат размером до 1–1,5 см с единичными прожилками геморрагий. ДПК на ограниченном участке до 1–2 см остава-

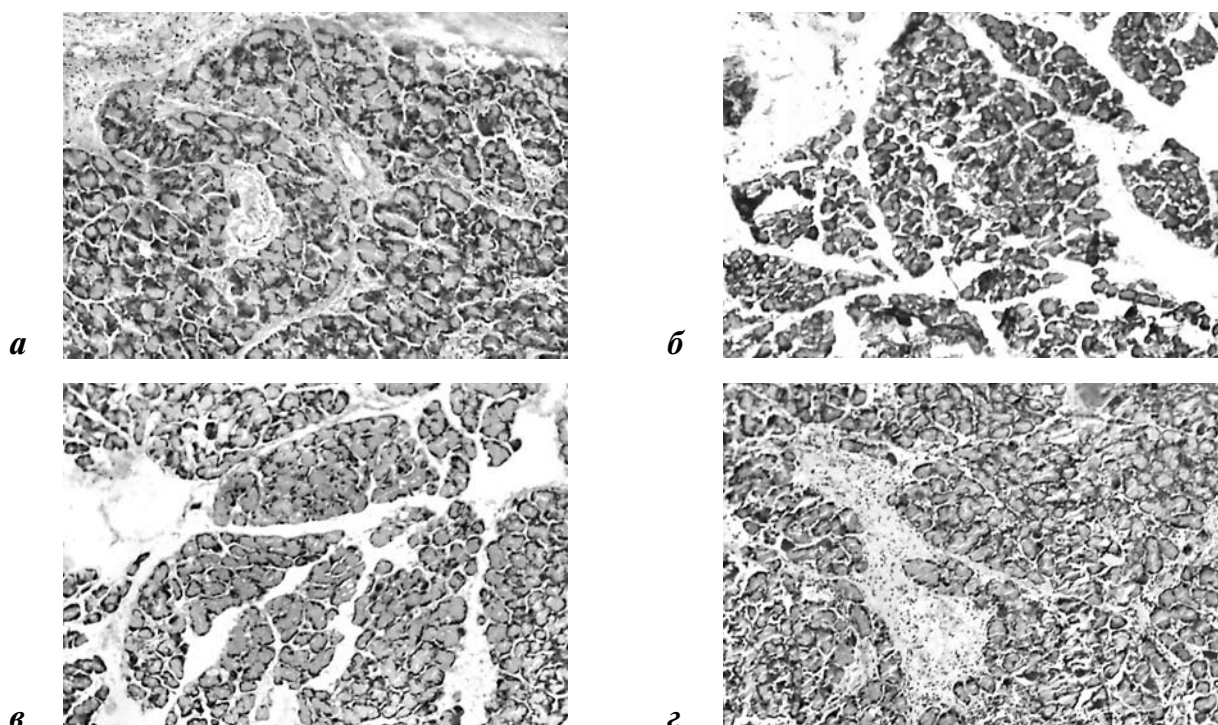


Рис. Морфология поджелудочной железы при моделировании острого панкреатита и его терапии при введении сандостатина и антисыворотки к змеиному яду. Окраска гематоксилином и эозином, увел. 100. *а* — терапия сандостатином острого панкреатита, вызванного введением змеиного яда, дистрофические изменения паренхиматозных клеток, умеренный периваскулярный отек и воспалительноклеточная инфильтрация; *б* — терапия сандостатином острого панкреатита, вызванного введением трипсина, сохранение выраженного интерстициального отека и дистрофических изменений паренхиматозных клеток; *в* — введение антисыворотки к змеиному яду при развитии острого панкреатита, вызванного введением змеиного яда, умеренный отек интерстиция, отсутствие некроза ткани; *г* — введение антисыворотки к змеиному яду при развитии острого панкреатита, вызванного введением трипсина, дистрофические и некробиотические изменения отдельных клеток паренхимы, умеренный периваскулярный отек и воспалительноклеточная инфильтрация.

лась отечной без признаков гиперемии. Гистологическое исследование выявило отсутствие некроза в ПЖ, но в ней, тем не менее, сохранялся отек интерстиция (**рис. б**). В печени и ДПК отмечались неравномерное полнокровие и вакуольная дистрофия гепатоцитов.

В целом сандостатин на фоне введения трипсина оказывал выраженное терапевтическое действие, состоящее в устранении гибели крыс, некроза ткани ПЖ, геморрагического повреждения органа, в заметном улучшении состояния органов брюшной полости.

3. Действие АС к змеиному яду при моделировании острого панкреатита введением яда

На модели острого панкреатита, вызванного змеиным ядом, введение АС существенным образом подавляло геморрагическое пропитывание ПЖ. В ДПК отек и гиперемия были ограничены участком размером до 2 см. В течение первого часа изменения органов брюшной полости прогрессировали как по интенсивности окраски, так и по размерам гиперемии, но никогда не принимали некротического характера. К концу 3-го часа состояние животных

стабилизировалось, патологические изменения внутренних органов несколько регрессировали.

Через 24 ч все крысы выживали и были активными. В ПЖ в области инъекции яда сохранялся инфильтрат с редкими точечными кровоизлияниями. Отмечался небольшой отек ДПК. Печень в ряде случаев была несколько темнее нормы и рыхлой. Других изменений со стороны органов брюшной полости не выявлено.

Строение ПЖ существенно не изменялось (**рис. в**), отмечались участки дистрофически измененных клеток, интерстициальный отек, очаги некрозов отсутствовали. В печени наблюдалось неравномерное полнокровие, жировая дистрофия гепатоцитов, некроз отсутствовал. В ДПК структура ворсинок была сохранена, отмечался умеренный отек.

Таким образом, АС к змеиному яду оказывала существенное терапевтическое действие на течение острого панкреатита, особенно через сутки после применения. Выраженный позитивный эффект отмечен и для других органов брюшной полости. Достигалась полная выживаемость животных.

4. Действие АС к змеиному яду при моделировании острого панкреатита введением трипсина

Сразу после инъекции АС сохранялось нарастание геморрагической имбибии ткани ПЖ, формировалась ярко-красная гематома размером до 1,5 см без четких контуров. В брюшной полости накапливался экссудат объемом до 1,5 мл с щелочной реакцией (рН 7–8), но с невысокой амилазной активностью (до 220 ед.). Возникали гиперемия и отек стенки ДПК, размеры очага достигали 2,5 см. Через 20–30 мин цвет печени менялся до темно-вишневого, но в дальнейшем обратимо светлел.

В течение 3 ч наблюдения состояние животных оставалось стабильным. Количество экссудата в брюшной полости существенно не увеличивалось, амилазная активность выпота брюшной полости не нарастала. Выраженность гиперемии в ПЖ и ДПК несколько снижалась, признаков некроза тканей не наблюдали. Печень восстанавливала обычный цвет.

Через 24 ч все крысы были живыми и активными. В ПЖ в области инъекции наблюдался характерный инфильтрат, присутствовали единичные точечные кровоизлияния. Отмечалась легкая отечность стенки ДПК. Других изменений со стороны органов брюшной полости не выявлено.

Гистологическая структура ПЖ была сохранена (рис. г), но отмечались отек стромы, полнокровие, участки дистрофических изменений, ограниченные кровоизлияния, умеренная воспалительная инфильтрация, островковая ткань была без изменений. В печени регистрировались неравномерное полнокровие, отек ткани, жировая дистрофия гепатоцитов, некротические изменения отсутствовали. В ДПК структура ворсинок была сохранена, наблюдался умеренный отек. Состояние квалифицировалось как abortивное течение воспалительной реакции органов брюшной полости.

Таким образом, в данном случае введение АС к змеиному яду с лечебной целью оказывалось также эффективным, воспалительный процесс в органах купировался и принимал обратимый характер. Характер изменений со стороны ПЖ и изученных висцеральных органов при применении сандостатина и АС к змеиному яду был сходным.

В заключение отметим, что в представленных экспериментах АС к змеиному яду в лечении острого панкреатита была практически такой же эффективной, как и сандостатин, применяемый в клинике, хотя действующие начала у них разные. Сандостатин (октреотид) является октапептидом, синтетическим аналогом гормона соматостатина, ингибирующим секреторную активность ацинарных клеток ПЖ.

Эффект сандостатина комплексный, поскольку включает также восстановление уровня соматостатина в ПЖ, снижение уровня свободных радикалов [10] и т.д. В терапии острого панкреатита сандостатин эффективен в ранние сроки, включая 12 и даже 16 ч после поражения органа [11]. Важно, что действие сандостатина связано, в первую очередь, с подавлением синтеза и освобождения секреторных ферментов, активируемых под действием трипсина и, вероятно, фосфолипазы змеиного яда.

Действие АС к змеиному яду характеризуется другим набором активностей. АС устраняет летальную, геморрагическую, некротизирующую, протеолитическую, фосфолипазную, коагулянтную, фибринолитическую активность яда при взаимодействии *in vitro* [2, 12]. Отмечается параллелизм в эффектах АС *in vitro* и *in vivo* [13]. Показана достаточно высокая корреляция между нейтрализацией летальной токсичности яда под действием АС к нему и ингибированием активности фосфолипазы А2 [13]. Ингибирование эндогенной панкреатической активности фосфолипазы А2 оказывает протективный эффект на ацинарные клетки ПЖ [14]. Важно, что АС к фосфолипазе А2 змеиного яда ингибирует также активность фермента тканей животных, в частности мышинных альвеолярных макрофагов и крысиных лимфоцитов [15], то есть можно ожидать, что АС к змеиному яду способна ингибировать активность эндогенной внутриклеточной фосфолипазы А2. Поэтому представляется вероятным, что АС к змеиному яду оказывает позитивный эффект не только благодаря устранению патогенетически важных факторов, участвующих в повреждении ПЖ и циркулирующих в крови, таких как протеолитическая, геморрагическая, фосфолипазная активности, индуцируемые моделированием острого панкреатита, но и способна подавлять эндогенную фосфолипазную активность в ацинарных клетках, рассматриваемую как ключевое звено в формировании панкреатита различной природы [6].

При этом тот факт, что АС к яду оказывает одинаково выраженное терапевтическое действие в отношении острого панкреатита, вызванного как трипсином, так и змеиным ядом, говорит о том, что, по-видимому, фосфолипазный компонент в существенной мере участвует в обоих вариантах моделирования панкреатита. Антинекротическая, антифосфолипазная, антигеморрагическая и другие виды активности АС к змеиному яду могут оказывать позитивный терапевтический эффект не только при панкреатите, но и при других патологических процессах. Важно отметить, что эффективность АС зависит от степени гетерологичности

исходных патогенетически важных белков-антигенов змеиного яда и подобных эндогенных белковых факторов в крови крыс, от способности антител АС связываться с гетерологичными белковыми повреждающими факторами, индуцируемыми патологическим процессом.

Литература

1. Rittenbury M.S., Hanback L.D. Snake antivenin. Effect on survival time in experimentally induced hemorrhagic pancreatitis // Arch. Surg. 1969. 99 (2): 179-184.
2. Camey K.U., Velarde D.T., Sanchez E.F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil // Toxicon. 2002. 40 (5): 501-509.
3. Rojas E., Quesada L., Arce V. et al. Neutralization of four Peruvian Bothrops sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment // Acta Trop. 2005. 93 (1): 85-95.
4. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis // Biochim. Biophys. Acta. 2000. 1477 (1): 146-156.
5. Gay C.C., Leiva L.C., Maruňak S. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from Bothrops alternatus venom // Toxicon. 2005. 46 (5): 546-554.
6. van Acker G.J., Perides G., Steer M.L. Colocalization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis // World J. Gastroenterol. 2006. 12 (13): 1985-1990.
7. Jayanthi G.P., Gowda T.V. Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom // Toxicon. 1988. 26 (3): 257-264.
8. Ferreira M.L., Moura-da-Silva A.M., Mota I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of Bothrops snakes by Bothrops jararaca antivenom // Toxicon. 1992. 30 (12): 1591-1602.
9. Шор Н.А., Левина В.П., Йоффе И.В. и др. Применение октреотида в лечении больных острым панкреатитом // Клин. хир. 2004. (2). 15-17.
10. Lata J., Dite P., Julinkova K. et al. Effect of octreotide on the clinical course of acute pancreatitis and levels of free oxygen radicals and antioxidants // Vnitr. Lek. 1998. 44 (9): 524-527.
11. Rueda C.J.C., Arguello de A.J.M., Ortega M.L. et al. Somatostatin in the treatment of established and severe acute pancreatitis in the rat // Rev. Esp. Enferm. Dig. 1991. 80 (3): 183-188.
12. Saravia P., Rojas E., Escalante T. et al. The venom of Bothrops asper from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms // Toxicon. 2001. 39 (2-3): 401-405.
13. Maria W.S., Cambuy M.O., Costa J.O. et al. Neutralizing potency of horse antithropic antivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods // Toxicon. 1998. 36 (10): 1433-1439.
14. Mössner J., Wessig C., Ogami Y., Keim V. Role of various phospholipases A2 and inhibitors in the pathogenesis and prevention of pancreatic acinar cell necrosis: studies with isolated rat pancreatic acini // Int. J. Pancreatol. 2000. 27 (1): 29-38.
15. Masliah J., Kadiri C., Pepin D. et al. Antigenic relatedness between phospholipases A2 from *Naja naja* venom and from mammalian cells // FEBS Lett. 1987. 222 (1): 11-16.

EFFECT OF ANTISERUM TO SNAKE VENOM IN MODELS OF ACUTE PANCREATITIS IN RATS

Aleksander Borisovich PUPYSHEV¹, Svetlana Ivanovna PROTSENKO¹, Vladimir Georgievich VISKUNOV^{1,2}, Aleksander Petrovich NADEYEV¹, Marina Aleksandrovna SINITSYNA², Aleksander Mikhailovich FESHCHENKO³, Zaza Yuzaevich CHUBENIDZE³

¹ Novosibirsk State Medical University of Roszdrav,
52, Krasnyi prospekt, Novosibirsk, 630091

² SI RI for regional pathology and pathomorphology of SB RAMS
2, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

³ Municipal clinical hospital
1a, A. Nevski str., Novosibirsk, 630075

Therapeutic application of antiserum to snake venom of *Vipera berus* (150 AE/kg of body weight) early in initiation of acute pancreatitis in rats caused by injection of Trypsin (50 mg/kg) or snake venom of *Vipera berus* (1 mg/kg) was studied. In both cases application of the antiserum sharply raised survival of rats, suppressed hemorrhagic necrosis of the pancreatic cells and damage of other organs of abdominal cavity. Therapeutic efficiency of the antiserum was as well as that of sandostatin. Positive action of the antiserum seems to be connected with inhibition of phospholipase A2 and suppression of hemorrhagic activities.

Key words: acute hemorrhagic pancreatitis, trypsin, snake venom, sandostatin, antiserum to snake venom, rats.

Pupyshev A.B. — candidate of Biological Sciences, senior researcher, e-mail: apupyshev@mail.ru

Protsenko S.I. — candidate of Medical Sciences, assistant of chair of polyclinic surgery

Viskunov V.G. — doctor of Medical Sciences, professor, senior researcher of laboratory of pathophysiology, general pathology and pathomorphology of SI RI for regional pathology and pathomorphology, professor of chair of hospital surgery of Novosibirsk State Medical University, e-mail: apupyshev@mail.ru

Nadeev A.P. — doctor of Medical Sciences, professor, professor of chair of pathologic anatomy

Sinitsyna M.A. — researcher of laboratory of pathophysiology, general pathology and pathomorphology

Feshchenko A.M. — candidate of Medical Sciences, deputy senior physician

Chubenidze Z.Y. — surgeon